密码子优化后的αB-晶状体蛋白基因毕赤酵母重组质粒的构建及表达的初步研究

冯雪，高香，牛纯青，刘堰**

西南大学生命科学学院，重庆 400715

摘 要：αB-晶状体蛋白属于小热休克蛋白蛋白家族，具有分子伴侣活性。在阿尔茨海默病大脑中，星形胶质细胞表达的αB-晶状体蛋白明显上调，并且这些上调的αB-晶状体蛋白紧密地分布在β-淀粉样蛋白沉积周围。为了在分子水平上研究胞外αB-晶状体蛋白在阿尔茨海默病中的作用机制，需要获得大量具有生物学活性的αB-晶状体蛋白。根据毕赤酵母密码子偏好性对人αB-晶状体蛋白基因进行优化，并在目的基因3'端加上6个组氨酸标签，优化后的基因克隆到巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）表达载体pPIC9K上；电转入毕赤酵母GS115中；优化确定最佳表达条件为：BMGY与BMMY的转接比为2:1，表达时间为72h，甲醇补加终浓度为0.5%；经Western-blotting鉴定，获得20kDa的目的蛋白，以及18.6kDa及13.1kDa两个个蛋白片段，重组目的蛋白出现了部分降解，纯化获得20 kDa目的蛋白；利用胰岛素还原法测定该片段具有分子伴侣活性，为进一步研究外源αB-晶状体蛋白在阿尔茨海默病中对星形胶质细胞的保护机制奠定基础。

关键词：αB-晶状体蛋白基因,巴斯德毕赤酵母,密码子优化,表达优化,分子伴侣活性

Construction of *Pichia pastoris* expression vector of codon optimized αB-crystallin gene and expression optimization

FENG Xue, GAO Xiang, NIU Chun-qing, LIU Yan

College of life science, Southwestern University, Chongqing 400715, China

Abstract: αB-crystallin is a member of the small heat shock protein family， which has the molecular chaperones activity. The expression of αB-crystallin increases obviously in astrocytes in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients, and colocalizes with β-amyloid (Aβ) protein deposition densely. In order to study the mechanism of extracellular αB-crystallin in Alzheimer's disease at molecular level, we need to obtain a large amount of active αB-crystallin. According to the *Pichia pastoris* codon preference, we optimized the codons of αB-crystallin gene and added six histidine residues at the 3′ terminal of the gene. Then we cloned the optimized gene into pPIC9K and transferred the vector into *Pichia pastoris* GS115 through the electroporation method. The best expression conditions are as follows: the transferring proportion of BMGY and BMMY is 2:1; the expression time is 72 h and adding the methanol to the final concentration to 0.5%. There are three protein fragments by Western Blot, and the molecular weights of them are: 20.0 kDa, 18.6 kDa and 13.1 kDa. The recombination protein was partially degraded and obtained the

purified 20 kDa fragment, which has molecular chaperones activity using insulin reduction method. The result may make a base line for further studying protection mechanism of exogenous αB-crystallin to astrocytes in Alzheimer's disease.

Key Words: aB-crystallin，Pichia pastoris，codon optimization，expression optimization molecular chaperone activity

αB-晶状体蛋白（αB-crystallin，Cryab）即α-晶状体蛋白B链，是眼晶状体蛋白的主要成分[1]。该蛋白在非晶状体组织，包括中枢神经系统也有表达[2]，Cryab作为小分子热休克蛋白（small heat-shock protein，sHSP），具有分子伴侣活性功能，并能防止蛋白积聚，起到保护细胞的作用。在阿尔茨海默症（Alzheimer's disease，AD）患者大脑中Cryab的表达上调，在星形胶质细胞和小胶质细胞中发现Cryab主要限于老年斑和神经纤维缠结，表明Cryab与AD中淀粉样蛋白沉积相关，但其因果关系尚未知[3-5]。已有研究表明，Cryab蛋白通过与Aβ蛋白直接结合等方式有效地阻止Aβ蛋白的聚集及其细胞毒性作用[6-7]。

近来研究发现[8]，αB-晶状体蛋白作为一种小分子热激蛋白，在一些磷酸化激酶的调节网络中扮演重要角色，而异常磷酸化蛋白与 AD 发病时神经纤维聚集有关。在血清缺乏和有毒试剂刺激下，通过激活 MAPK，PI3K / Akts 信号通路和抑制脑内线粒体产生 ROS，外源的 Cryab 蛋白保护星形胶质细胞免于细胞死亡，起有效的细胞保护作用[9]。Ewa Papuć [10]等研究指出 AD 患者 Cryab 蛋白上调会引发体液免疫应答，IgM 和 IgG 自身抗体的滴度增加可用作疾病生物标志物。人 Cryab 蛋白可能是衰老细胞和组织中内源性保护机制的一个重要组成部分。人 Cryab 蛋白的多功能活性源自暴露在分子表面上的相互作用肽序列。多个非共价相互作用序列可以解释 Cryab 蛋白对未折叠蛋白质起作用的选择性和灵敏性[11]。因此，得到具有生物学活性的αB-晶状体蛋白对于研究外源αB-晶状体蛋白在阿尔茨海默病中对星形胶质细胞的保护机制，进而探索 AD 发病机制和治疗具有重要意义。为进一步外源αB-晶状体蛋白在阿尔茨海默病中对星形胶质细胞的保护机制奠定基础。

随着蛋白质重组技术的发展和重组多肽类药物在临床中的应用，αB-晶状体蛋白主要在大肠杆菌表达中表达[12-13]。毕赤酵母作为真核表达系统，相较于大肠杆菌等原核表达系统，具有的蛋白加工修饰的能力和先进的表达调控机制，如：磷酸化、糖基化、酰胺化及蛋白酶水解等蛋白功能。利用毕赤酵母进行分泌表达，具有杂蛋白少的特点，有利于重组目的蛋白的纯化。因此，我们期望通过毕赤酵母表达系统表达得到具有生物学活性、空间结构更

加接近于天然蛋白的人αB-晶状体蛋白。

1　材料与方法

1.1　实验材料

Pichia pastoris 整合型分泌表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司;毕赤酵母菌株 GS115，宿主菌 *E.coli*（DH5α）本实验室保存；各类限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,RNAse 购自上海生工公司;引物由上海英俊（Invitrogen）公司完成；胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自天根生物。YPD、BMGY 和 BMMY 培养基均按 Invitrogen 公司的毕赤酵母菌实验操作手册配制。

1.2　实验方法

1.2.1　αB-晶状体蛋白密码子优化

参照 Gene Bank 中 Cryab 基因序列，根据毕赤酵母密码子偏好，在不改变氨基酸序列的前提下，利用密码子优化软件对 αB-晶状体蛋白基因进行密码子优化，并在序列的 5’端设计了 *Xho* I 酶切位点，在 3’端设计了 *Eco*R I 酶切位点。将优化构建好的基因序列送至上海生工公司合成，合成的基因连接到 pMD-18T 载体中。

1.2.1　毕赤酵母表达载体的构建

Cryab 基因扩增：为便于目的蛋白用亲和层析法进行纯化，在 Cryab 全长序列上加入一段 6 个组氨酸的 His 标签。以 pMD-18T 载体（含有 Cryab 全长 cDNA）为模板，用合成的上游引物和下游引物（表 1）进行 PCR 扩增。

表 1　Cryab 扩增引物

Table 1　The primers used for Cryab

Primer name	Primer sequence (5′–3′)
Forward	CCGCTCGAGAAAAGAATGGACATCGCTATTCATCATCC（下划线为 *Xho* I 和 *Kex*2 酶切位）
Reverse	GACGACGAGGATTCTTCGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTATTCCTTAAGGCC（下划线为 *Eco*R I 酶切位点）

重组载体的构建：将扩增得到基因和 pPIC9K 分别用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行酶切，将回收酶切后的目的基因片段与 pPIC9K 载体片段以摩尔浓度比 3/1 加入到 PCR 管中，加入 T4 DNA 连接酶后 16℃连接过夜。将连接物转入大肠杆菌 DH5α感受态细胞中，利用含有相应抗生素（Amp）的 LB 固体培养基进行筛选，经菌落 PCR 筛选阳性克隆大肠杆菌菌株，酶切鉴定后，进一步送至上海英潍捷基贸易有限公司测序。

Cryab 毕赤酵母表达菌株的构建：提取质粒 Cryab/pPIC9K，用 *Sac* I 酶切线性化后，电击法转化 GS115 感受态细胞。电转完成后涂布 RDB 平板，30℃培养 48h 左右，观察到酵母重组转化子的乳白色菌落出现。经菌落 PCR 鉴定阳性重组子，获得 Cryab 毕赤酵母表达菌株。

1.2.3　αB-晶状体蛋白的鉴定和表达优化

αB-晶状体蛋白鉴定：表达上清经 SDS-PAGE 后，15V，40min 电转移至聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，于含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中 4℃封闭过夜，一抗为 His-Tag 鼠抗兔 37℃孵育 1h，二抗为 HRG 标记的羊抗鼠 IgG37℃孵育 2h，经过显影定影，通过目的条带在胶片的位置判断目的蛋白的表达情况和分子量大小。

单因素优化：参照 Invitrogen Multi-Copy Pichia Expression Kit 手册，筛选到的阳性菌株进行小量诱导表达筛选

高表达菌株。筛选到的高表达菌株进行大量表达，在其他条件一致的情况下进行单因素条件优化，分别对诱导时间，BMGY 换成 BMMY 的转接比例，甲醇补加量进行优化分析。

正交优化：根据单因素条件优化结果，选用正交设计法的 L_9（3^4）表,以甲醇为 A 因素(处理水平为 0.5%、0.75%、1%)，BMGY 与 BMMY 的体积比为 B 因素(1∶2 、1∶1 、2∶1)，发酵时间为 D 因素(处理水平为 60h、72h、84h)，按设计方案控制表达条件，以αB-晶状体蛋白的浓度为指标，确定最优发酵方案。

1.2.4　αB-晶状体蛋白纯化和鉴定

利用最优发酵条件进行目的蛋白的表达，得到的发酵液进行离心去除菌体，将收集的上清用 0.22μm 滤膜过滤后，与 Ni-6FF 混合 4℃过夜，进行上样，分别用 50mM 和 200mM 咪唑 pH 为 7.4 的 PBS 洗脱液进行分步洗脱，收集洗脱液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

利用蛋白质印迹法鉴定纯化得到的重组目的蛋白。

1.2.5 重组 Cryab 蛋白活性测定

应用胰岛素还原实验检测[14]αB-晶状体蛋白的分子伴侣活性，原理为αB-晶状体蛋白具有分子伴侣活性，能够抑制还原剂引起的胰岛素 B 链聚集而产生的沉淀反应，从而判断重组蛋白是否有分子伴侣活性。

实验分为三组，分别为阴性对照组，阳性对照组和实验组。阴性对照组只加 PBS 缓冲液，阳性对照组加入胰岛素（0.8mg/mL, 20mM 磷酸盐缓冲液）和还原剂二硫苏糖醇（Dithiothreitol，DTT，8.0 mg/mL，20mM 磷酸盐缓冲液）；实验组为胰岛素、DTT 和αB-晶状体蛋白（胰岛素与αB-晶状体蛋白质量比为 1:1）。利用分光光度计检测可见光值，记录数据；重复三次实验，取平均值，并作曲线图，进行统计学分析。

2　结果

2.1　密码子的优化

通过调整 G+C 含量，在不改变氨基酸的前提下，对 Cryab 基因的密码子进行优化，其中涉及 109 个密码子的改变，覆盖 86 个氨基酸，并在终止密码子前加入了 6*His 纯化标签。

2.2　质粒 Cryab/pPIC9K 的构建及鉴定

以合成的 pMD-Cryab 质粒为模板，利用上、下游引物进行目的基因扩增。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，目的基因约 546bp（图 1a），与预期大小一致。Cryab/pPIC9K 质粒经 *Xho* I/*Eco*R I 酶切鉴定，其中一段与目的基因大小相符（546bp），证明 Cryab 已成功连接到 pPIC9K 载体上。经测序，进一步确定插入片段阅读框和方向是正确的。

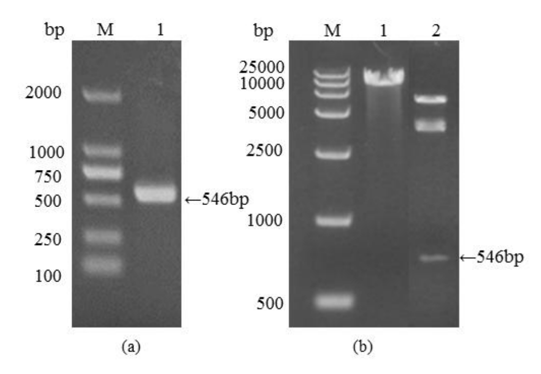


图 1　Cryab　PCR 产物凝胶电泳及重组质粒酶切鉴定

Fig. 1　Gel electrophoresis of Cryab gene PCR products and identification of recombinant colonies by enzyme digestion.

(a) 1: Positive PCR results. (b) 1: Recombinant plasmid digested with *Sac* I; 2: Recombinant plasmid digested with *Xho* I and *EcoR* I.

2.3　毕赤酵母表达菌的构建和筛选

线性化的重组质粒电转化进入毕赤酵母 GS115。菌落 PCR 鉴定，结果显示 1, 3-12, 14-21 泳道在 500bp-750bp 之间均出现了目的条带（图 2），表明外源基因和酵母染色体发生同源重组，获得了重组酵母菌株。

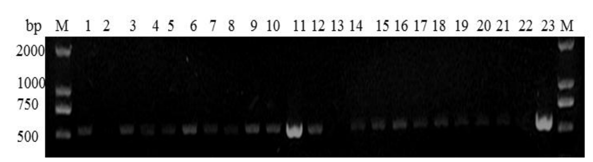


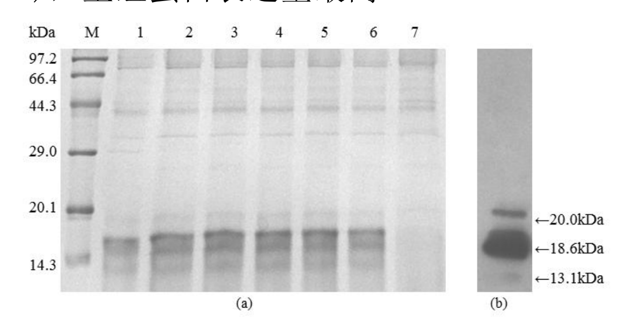
图 2 酵母菌落 PCR 结果

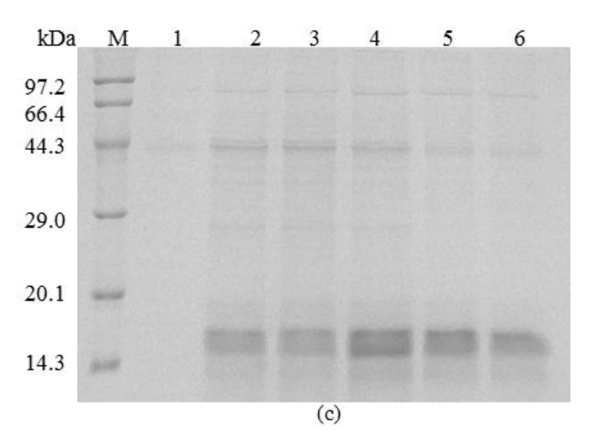
Fig. 2　Yeast PCR Screening results.

1, 3-12, 14-21: Positive clones; 2, 13, 22: Negative clones; 23: Positive control.

2.4　重组蛋白表达条件优化

对表达时间、转接比和甲醇补加量进行单因素优化，SDS-PAGE 结果显示诱导表达至 60h、72h、84h 时，发酵上清的目的蛋白含量相对较高(图 3a)；转接比为 1:1 时，目的蛋白表达量最高（图 3c）；每隔 12h 补加甲醇至终浓度 0.75%，重组目的蛋白表达量最高（图 3d）。Western-blotting 分析出现分子量为 20kDa、18.6kDa、13.1kD 三条蛋白片段（图 3b）。L_9（3^4）正交优化实验结果表明转接比为 2:1，甲醇补加量为 0.5%，发酵时间为 72h 时（表 2），重组蛋白表达量最高。





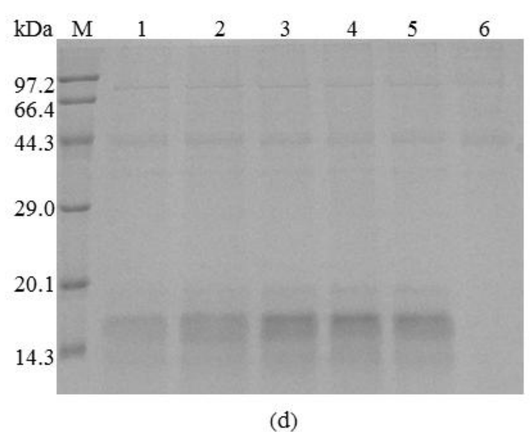


图 3 诱导时间 、转接比、甲醇对重组αB-晶体体蛋白的影响和 Western-blotting 鉴定

Fig. 3　Effect of induction time, transfer ratio and methanol concentration on the recombinant protein and Western-blotting analysis.

(a) Induction time, M: Low Molecular Weight Protein Marker; 1-6: Target protein with expressed by 36h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h, 96 h; 7: Negative Control (pPIC9K/GS115). (b) Western-blotting analysis of recombinant protein. (c) Transfer ratio, 1: Negative Control; 2-6: Transfer ratio of 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1. (d) Methanol concentration, 1-5: Methanol complement: 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.75%, 0.5%, 0.25%;

6: Negative Control (pPIC9K/GS115).

表 2 重组 CRYAB 表达条件 L9（3⁴）正交优化结果

Table 2 Recombinant CRYAB expression condition orthogonal L9 (3^4) optimization results

Number	Transfer ratio	Methanol (%)	Expression time(h)	Protein concentration (mg/L)
1	3:1	0.25	60	147.8
2	3:1	0.50	84	177.7
3	3:1	0.75	72	183.5
4	2:1	0.25	84	155.3
5	2:1	0.50	72	230.1
6	2:1	0.75	60	217.2
7	1:1	0.25	72	178.2
8	1:1	0.50	60	189.5
9	1:1	0.75	84	188.4
k1	169.67	160.43	184.83	
k2	200.87	199.10	192.27	
k3	185.37	196.47	173.13	
R	30.33	38.67	19.14	

2.5 重组蛋白的分离纯化及鉴定

发酵上清与 Ni-6FF 混合上样后，通过含有 50mM 和 200mM 咪唑的 PBS 洗脱，得到样品通过 SDS-PAGE 分析（图 4a），结果表明：重组蛋白全部挂柱，可见上样后的穿过峰溶液中没有重组蛋白，收集到的 50mM 咪唑洗脱液中可见分子量为 18.6kDa 的蛋白片段，200mM 咪唑洗脱液中可见分子为 20kDa 的蛋白片段。经 Western-blotting 鉴定，证实纯化得到的目的蛋白为 20kDa（图 4b）。

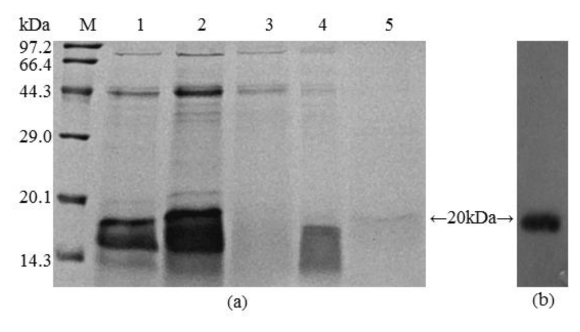


图 4 重组蛋白的纯化和 Western-blotting 鉴定

Fig.4 Purification of recombinant protein and Western-blotting analysis of recombinant protein.

(a) M: Low Molecular Weight Protein Marker; 1, 2: Fermentation supernatant; 3: Through peak; 4: 50mM elution peak; 5: 200mM elution peak. (b) Western-blotting analysis of recombinant protein.

表 3 αB-晶状体蛋白纯化过程总结

Table 3 Summary of the purification of αB-crystallin

Purification step	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Purity (%)	Percentage yield (%)
Fermentation supernatant	200.0	59.8	78.9	100.0
Ni-6FF	30.0	12.0	98.0	24.9

2.6 αB-晶状体蛋白的分子伴侣活性测定

用胰岛素还原实验对毕赤酵母表达的αB-晶状体蛋白进行了分子伴侣活性检测，结果显示，阳性对照组 A_{650} 吸收值高于实验组（图 6），说明毕赤酵母表达的αB-晶状体蛋白具有生物活性，能抑制还原剂 DTT 引起的胰岛素 B 链聚集反应，说明重组目的蛋白具有分子伴侣活性。

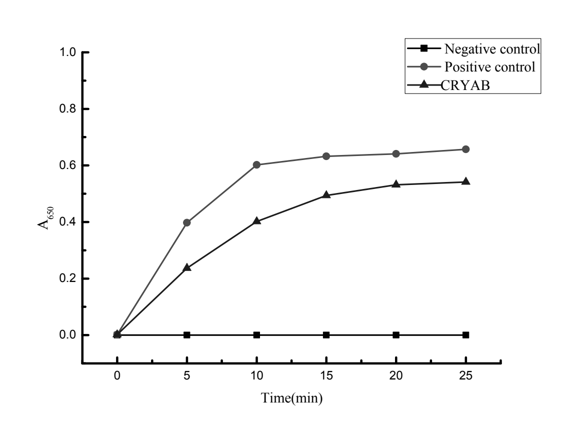


图 6 αB-晶状体蛋白分子伴侣活性测定

Fig. 6 Detection of the molecular chaperones activity of recombinant aB-crystallin

3 讨论

本实验根据毕赤酵母的密码子偏爱性对编码αB-晶状体蛋白 cDNA 进行了优化，确保了目的蛋白在毕赤酵母中的顺利表达。成功构建了 Cryab/pPIC9K 载体，通过对表达条件进行优化，确定该菌株的最适表达条件为 BMGY 转接到 BMMY 的比例为 2:1，发酵时间 72 小时，每 12 小时补加甲醇至终浓度 0.5%，各个因素的影响依次为：甲醇浓度>转接比>发酵时间。

从 NCBI 上查得人的 Cryab 蛋白分子量为 20kDa,大肠杆菌表达得到的分子量也为 20kDa[15]。毕赤酵母表达的αB-晶状体蛋白经 SDS-PAGE 及蛋白印迹分析,发现分子量分别为 20kDa、18.6kDa 及 13.1kDa 三条蛋白片段，其中以 18.6kDa 为主，推测可能是在表达过程中αB-晶状体蛋白出现了部分降解。在纯化过程中，我们发现这三种分子量的蛋白都能挂柱，200mM 咪唑洗脱获得纯化的分子量为 20kDa 的αB-晶状体蛋白条带。

迄今为止，利用毕赤酵母表达外源目的蛋白的工业技术已经相当成熟，但在表达载体构建时添加了 *Kex*-2 酶切位点后，仍然出现了目的蛋白降解的情况鲜有发生。通过查阅文献得知，毕赤酵母的液泡内存在各种蛋白水解酶，其水平根据营养条件而变化[16]，其中主要的蛋白酶为蛋白酶 A，蛋白酶 B，羧肽酶和氨肽酶[17]。已有研究表明，当蛋白酶 A 过表达时，其会分泌到毕赤酵母胞外[18]。酵母细胞在遭受到饥饿环境、碳源、温度和 pH 的改变时细胞膜会发生裂解。在 Jayanta Sinha[19]的研究中，甲醇营养型毕赤酵母利用 AOX1 启动子诱导蛋白表达时，也触发了胞内蛋白酶的过表达和细胞裂解。因此推测在发酵过程中，由于酵母细胞的裂解，导致胞内蛋白酶释放到培养基中，导致目的蛋白的降解。此外，在甲醇营养型的巴斯德毕赤酵母中，利用甲醇代谢需要高氧，并且氧代谢将产生过氧化氢，过量有毒副产物的产生导致其分泌到细胞溶质，并最终到培养基中[20]，在这些压力条件下，酵母细胞通过水解不必要的蛋白质，以提供氨基酸用于新蛋白质的合成 [21]，我们的目的蛋白属于外源蛋白，在酵母利用甲醇进行代谢时，我们的目的蛋白可能被水解成氨基酸，用于其它蛋白的合成。

利用胰岛素还原实验确定表达得到的重组αB-晶状体蛋白具有分子伴侣活性。

进一步可对 Cyrab 进行改构，以解决 Cyrab 蛋白降解问题；其次，可以比较毕赤酵母表达系统和大肠杆菌表达系统所得到的的αB-晶状体蛋白的生物学活性，以及对于后续研究的影响，得到αB-晶状体蛋白更适合的表达系统；纯化得到的蛋白具有生物学活性，因此可以用来进行后续实验。为探究αB-晶状体蛋白在阿尔兹海默症的发病机制扮演的角色，找到 AD 治疗方法奠定基础。

REFERENCES

[1] Wistow G J, Piatigorsky J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. Biochemistry, 1988, 57(57): 479-504.

[2] Bhat S P, Nagineni C N. B subunit of lens-specific protein α-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissue. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 158(1): 319-325.

[3] Renkawek K, Voorter C E, Bosman G J, et al. Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, 1994, 87(2): 155–160.

[4] Björkdahl C, Sjögren M J, Zhou X, et al. Small heat shock proteins Hsp27 or αB-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: Tau and neurofilaments. Journal of Neuroscience

Research, 2008, 86(6): 1343-1352.

[5] Mao J J, Katayama S, Watanabe C, et al. The relationship between aB-crystallin and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s diseases. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001, 27(3): 180–188.

[6] Dehle F C, Ecroyd H, Musgrave I F, et al. αB-Crystallin inhibits the cell toxicity associated with amyloid fibril formation by κ-casein and the amyloid-β peptide. Cell Stress and Chaperones, 2010, 15(6): 1013-26.

[7] Shammas S L, Waudby C A, Wang S, et al. Binding of the molecular chaperone αB-crystallin to Aβ amyloid fibrils inhibits fibril elongation.[J]. Biophysical Journal, 2011, 101(7): 1681-1689.

[8] Dammer E B, Lee A K, Duong D M, et al. Quantitative phosphoproteomics of Alzheimer's disease reveals cross-talk between kinases and small heat shock proteins. PROTEOMICS, 2015, 15(2-3):508–519.

[9] Zhu Z, Li R, Stricker R, et al. Extracellular α-crystallin protects astrocytes from cell death through activation of MAPK, PI3K/Akt signaling pathway and blockade of ROS release from mitochondria. Brain Research, 2015, 1620:17-28.

[10] Papuć E, Krupski W, Kurys-Denis E, et al. Antibodies against small heat-shock proteins in Alzheimer’s disease as a part of natural human immune repertoire or activation of humoral response. J Neural Transm, 2016, 123(4): 455-461.

[11] Clark J I. Functional sequences in human alphaB crystallin. Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1860:240-245.

[12] Sun T X, Das B K, Liang J J. Conformational and functional differences between recombinant human lens αA-and αB-Crystallin. J Biol Chem, 1997, 272(10): 6220-6225.

[13] Horwitz J, Huang Q L, Ding L, et al. Lens α-crystallin: Chaperone-like properties. Methods in Enzymology, 1998, 290(98): 365-83.

[14] Saha S, Das K P. Relationship between chaperone activity and oligomeric size of recombinant human alphaA- and alphaB-crystallin: a tryptic digestion study. Proteins Structure Function & Bioinformatics, 2004, 57(3): 610-617.

[15] Sun T X, Das B K, Liang J J. Conformational and functional differences between recombinant human lens alphaA- and alphaB-crystallin. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(10): 6220-5.

[16] Hansen R J, Switzer R L, Hinze H, et al. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. Biochimica Et Biophysica Acta, 1977, 496(1): 103-114.

[17] Hb V D H, Kiellandbrandt M C, Winther J R. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. Yeast, 1996, 12(1):1-16.

[18] Rothman J H, Hunter C P, Valls L A, et al. Overproduction-induced mislocalization of a yeast vacuolar protein allows isolation of its structural gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(10): 3248-52.

[19] Sinha J, Plantz B A, Inan M, et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast Pichia pastoris: Case study with recombinant ovine interferon-τ. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(1): 102–112.

[20] Stevens T H, Rothman J H, Payne G S, et al. Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y. Journal of Cell Biology, 1986, 102(5): 1551-7.

[21] Hilt W, Wolf D H. Stress-induced proteolysis in yeast. Molecular Microbiology, 1992, 6(17): 2437-42.